

นางสาวณัชชา พุกยามะธำนันท์ : การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อไวรัสพิษสุนัขบ้า ด้วยเทคโนโลยีเฟจ (PRODUCTION OF HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RABIES VIRUS USING PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.มณฑารพ ชมาภัย, 159 หน้า.

โมโนโคลนอลแอนติบอดีของมนุษย์ที่จำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้า ถูกคัดเลือกจากคลังแอนติบอดี (scFv) มนุษย์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (คลัง YAMO-I) และคลังที่ถูกกระตุ้นด้วยไวรัส (คลัง Yamo-Rb) ด้วยเทคโนโลยีเฟจ โดยทำการคัดเลือก (ไบโอแพนนิ่ง) จำนวน 1-5 รอบ โดยใช้เชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้าที่หมดฤทธิ์แล้ว (inactivated virus) 2 ชนิด คือ PCEC และ PVRV และไกลโคโปรตีนจากผิวของไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า (RVG) เป็นเป้าหมายในการคัดเลือก ซึ่งสามารถคัดเลือกโคลนที่สามารถจับจำเพาะต่อเชื้อพิษสุนัขบ้าได้จำนวน 16 โคลน ได้แก่ IRA7c (IVB4cv), IIIRC2c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IYB5v, IRC3c, IYB4v, IYB5v, IYB8v, IYD4v, R1, R4 และ Y6 ผลจากการทดสอบโดยใช้วิธีการอีไลซ่าพบว่า โคลนเหล่านี้มีความสามารถในการจับจำเพาะได้ดีต่อเชื้อหรือไกลโคโปรตีนที่ใช้ในการคัดเลือก อย่างไรก็ตามบางโคลนสามารถจับจำเพาะกับทั้งเชื้อและไกลโคโปรตีน โคลนที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้เฉพาะไกลโคโปรตีนทั้งหมดเป็นชิ้นส่วนของแอนติบอดีแบบเส้นเดี่ยว (scFv) และไม่มีความสามารถที่จะจับเชื้อไวรัส (PCEC และ PVRV) ได้ ลำดับเบสของดีเอ็นเอได้ถูกวิเคราะห์โดยวิเคราะห์ลำดับเบสอัตโนมัติ จากนั้นได้ทำการศึกษาลำดับกรดอะมิโนของแอนติบอดี รวมทั้งได้ทำนายโครงสร้างสามมิติของแอนติบอดีโคลน IYF5c, IRA7c และ IIIRC2c ด้วย นอกจากนี้แล้วยังได้นำแอนติบอดีบางตัวไปสร้างให้เป็นแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่เชื่อมต่อกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (scFv-AP) เพื่อให้สะดวกในการตรวจจับด้วยวิธีอีไลซ่า อีกทั้งได้ทำการนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า ซึ่งพบว่า โคลน IRA7c และ IIIRC2c มีความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ หลังจากนั้นได้นำแอนติบอดีเส้นเดี่ยวบางโคลนมาผลิตเป็นแอนติบอดีเส้นเดี่ยวที่ไม่ติดอยู่บนผิวเฟจ โดยให้ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์อีโคไล เอส บี 2151 หรือ โคลนเข้าเวกเตอร์ pET27b แล้วผลิตแอนติบอดีเส้นเดี่ยวจากแบคทีเรียสายพันธุ์บีแอล 21 คือ 3 จากนั้นนำแอนติบอดีเหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการจับเชื้อไวรัสก่อโรคพิษสุนัขบ้า โดยใช้วิธีการอีไลซ่า สุดท้ายแอนติบอดีบริสุทธิ์ IYF5c, IRA7c และ IIIRC2c ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า ผลจากการทดสอบพบว่า IYF5c ซึ่งแสดงความสามารถในการจับได้เป็นอย่างดีกับเชื้อไวรัสชนิดตาย (PCEC) ไม่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคได้เลย มีเพียง IRA7c และ IIIRC2c ซึ่งได้รับการคัดเลือกมาจากคลังแอนติบอดีมนุษย์ที่ได้รับ

การกระตุ้นด้วยเชื้อพิษสุนัขบ้าเท่านั้น ที่มีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้าได้ โดยมีความสามารถยับยั้งการก่อโรคพิษสุนัขบ้า 4.54 IU/mg และ 0.20 IU/mg ตามลำดับ ดังนั้นจึงสามารถนำแอนติบอดีทั้งสองไปพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาและวินิจฉัยโรคพิษสุนัขบ้าได้ต่อไปในอนาคต



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

NATCHA PRUKSAMETANAN : PRODUCTION OF HUMAN
MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST RABIES VIRUS USING
PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.
MONTAROP YAMABHAI, Ph.D., 159 PP.

PHAGE DISPLAY/RABIES VIRUS/SINGLE-CHAIN FRAGMENT (scFv)/
HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY

Human monoclonal antibodies against the rabies virus were selected from non-immunized human scFv library (YAMO-I library) and immunized library (Yamo-Rb library) by using phage display technology. The affinity selection (Bio-panning) was performed for 1-5 rounds by using two types of inactivated rabies vaccines as targets. These were purified vero cell rabies vaccine (PVRV) and purified chick embryo cell vaccine (PCEC). In addition, a viral coat protein (RVG) was also used as a target for biopanning. A total of 16 positive clones from various methods of biopanning that can bind specifically to rabies virus, i.e.; IRA7c (IVB4cv), IIIRC2c, IRC3c, IYC11c, IYC12c, IYD1c, IYF5c, IIRD5v, IYB5v, IYG4v, IYE5v, IYG8v, IYD4v, R1, R4 and Y6 were isolated and their genes were sequenced. The ELISA results showed that the positive clones always bind strongly to the targets that were used for the biopanning. However, some clones can cross-react to the related virus. All of the clones isolated using viral glycoprotein contained only partial scFv fragments and none of them could bind to the whole inactivated virus (PCEC and PVRV). The amino acid sequence analysis of the selected clones was performed using information obtained from automated DNA sequencing. The 3D structure of clones IYF5c, IRA7c

and IIIRC2c were predicted. In addition, selected scFv clones were engineered to create scFv- alkaline phosphatase (scFv-AP) fusions and used as reagents for one-step detection in the ELISA format. *In vitro* neutralization assay using different phage clones showed that clones IRA7c and IIIRC2c could inhibit viral infection. The selected scFv antibody fragments were expressed as soluble forms using *E. coli* non-suppressor strain, HB2151, or cloned into pET27b vectors and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Then selected soluble antibody fragments were tested for their ability to bind the rabies virus by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Finally, purified soluble scFv antibody fragments of clones IYF5c, IRA7c and IIIRC2c were tested for neutralization activity. While clone IYF5c interacted specifically and strongly to the PCEC target, it did not neutralize the virus. Only clones IRA7c and IIIRC2c, which were derived from immunized library showed neutralization of the rabies virus *in vitro* at 4.54 IU/mg and 0.20 IU/mg, respectively. These isolated recombinant scFv antibodies could be further developed to be used for diagnostic and therapeutic purposes in the future.

School of Biotechnology

Academic Year 2013

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature _____